

JP2002308779

Publication Title:

AGENT FOR PROMOTING PROPAGATION, DIFFERENTIATION AND/OR SURVIVAL OF GLIA CELL, CONTAINING CYCLIC PHOSPHATIDIC ACID

Abstract:

Abstract of JP2002308779

PROBLEM TO BE SOLVED: To elucidate a possibility of cPA as a therapeutic agent of cranial nerve disturbances such as Alzheimer's disease, a neuropathy in ischemia, Parkinson disease, etc., especially cerebrovascular dementias such as Binswanger type dementia, etc., by analyze an activity of cPA to glia cells as a new physiological activity. **SOLUTION:** This cerebrovascular dementia-treating agent contains a cyclic phosphatidic acid derivative expressed by the general formula (I) (wherein, R is a 1-30C linear chain or branched state alkyl, a 2-30C linear chain or branched state alkenyl or a 2-30C linear chain or branched state alkynyl, which may be substituted by a cycloalkane ring or an aromatic ring; and M is H or a pair cation) as an active ingredient.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-308779

(P2002-308779A)

(43)公開日 平成14年10月23日 (2002.10.23)

(51)Int.Cl.⁷

A 6 1 K 31/661
A 6 1 P 25/00
25/28
C 1 2 N 5/06

識別記号

F I

A 6 1 K 31/661
A 6 1 P 25/00
25/28
C 1 2 N 5/06

マークト^{*}(参考)

4 B 0 6 5
4 C 0 8 6

E

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 22 頁)

(21)出願番号

特願2001-115999(P2001-115999)

(22)出願日

平成13年4月13日 (2001.4.13)

(71)出願人 500038570

株式会社ジェンコム
東京都町田市南大谷11号

(72)発明者 室伏 きみ子

埼玉県浦和市辻4-12-17

(72)発明者 阿相 鮎児

東京都西東京市中町1-11-28

(72)発明者 小林 哲幸

東京都板橋区蓮沼町63-4

(74)代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス (外4
名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 環状ホスファチジン酸を含むグリア細胞の増殖、分化及び/又は生存の促進のための薬剤

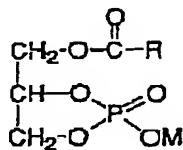
(57)【要約】

【課題】 cPAの新しい生理活性として、グリア細胞への作用を解明し、アルツハイマー病、虚血時の神経障害、パーキンソン病などの脳神経障害、特に、ビンズワーグー型痴呆などの脳血管性痴呆の治療薬としての可能性を明らかにする。

分として含む脳血管性痴呆治療剤。

【解決手段】 一般式(I)

【化1】

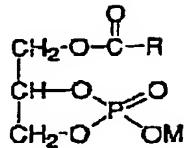


(式中、Rは、シクロアルカン環又は芳香環によって置換されてもよい、炭素数1~30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基又は炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、Mは、水素原子又は対カチオンである)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(I)：

【化1】

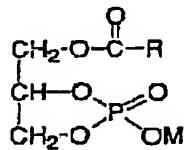


(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤。

【請求項2】 グリア細胞が、オリゴデンドロサイト、シェワン細胞、アストロサイトまたはミクログリアから選択されることを特徴とする、請求項1に記載の薬剤。

【請求項3】 一般式(I)：

【化2】



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、グリア細胞の減少に起因する神経疾患の治療及び／又は予防のための薬剤。

【請求項4】 グリア細胞の減少を伴なう神経疾患が脳血管性痴呆である、請求項3に記載の薬剤。

【請求項5】 脳血管性痴呆がビンスワンガー型痴呆である、請求項4に記載の薬剤。

【請求項6】 一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体が、1-オレオイル環状ホスファチジン酸である、請求項1から5の何れかに記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、リゾリン脂質の一種である環状ホスファチジン酸誘導体を含む薬剤に関する。より詳細には、本発明は、グリア細胞への作用を有する環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含むグリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための

薬剤、並びにグリア細胞の減少を伴なう神経疾患の治療及び／又は予防のための薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術】生体膜を構成している主成分であるグリセロリン脂質は、一般にグリセロール骨格に疎水性の脂肪酸が2分子結合し、さらにリン酸基を介してコリンやエタノールアミンなどの親水性基が結合している。リン脂質における疎水性部分と親水性部分とのバランスが、安定な脂質二重層を形成する上では重要である。これに対してもリゾリン脂質は、脂肪酸が1分子のみ結合したものであり、疎水性部分が親水性基に対して相対的に小さくなるため、安定な膜構造をとれず、逆にそれを壊す界面活性作用を示す。

【0003】しかし、近年、低濃度で特有の生理活性を示すリゾリン脂質が多数見つかっており、そのうちの一つとしてリゾホスファチジン酸(lysophosphatidic acid; LPA)が挙げられる。LPAは最も単純な構造を持つリン脂質の一つであり、グリセロールのsn-1位あるいは2位の脂肪酸のどちらか一方が脱アシル化されている点でホスファチジン酸(phosphatidic acid; PA)とは相違する(図1を参照)。

【0004】LPAは、生体内にごく微量(細胞全リン脂質中の0.5%以下)しか存在しない。従来、LPAはリン脂質生合成の中間産物又は分解中間物と考えられていた。しかし、1970年代後半に、血漿中(Schumacher, K.A., 他, Thromb. Haemostas., 42, 631-640(1979))やダイズ粗レシチン画分中(Tokumura, A., 他, Lipids, 13, 468-472(1978))に存在する血管収縮作用を示す物質がLPAであると同定された。更に、血清中の脂質性増殖因子がLPAであることも示され(van Corven, E., 他, Cell 59, 45-54(1989))、LPAは生理活性脂質として注目されるようになった。

【0005】LPAには、細胞増殖促進作用(Fischer D.J., 他, Mol Pharmacol, 54, 979-988(1988))、癌細胞の浸潤促進(Imamura, F., 他: Jpn. J. Cancer Res., 82, 493-496(1991); Imamura, F., 他: Biochem. Biophys. Res. Commun., 193, 497-503(1993); 及びImamura, F., 他: Int. J. Cancer, 65, 627-632(1996))、アポトーシスの抑制(Umnaky, S.R., 他: Cell Death Diff., 4, 608-616(1997))などを含む多様な生理活性のあることが今まで明らかにされている。特に、神経細胞に対しても、LPAは神経突起の退縮を引き起こすことが知られている(Tigyi, G., 他: J. Biol. Chem., 267, 21360-21367(1992); Jalink, K., 他: Cell Growth & Differ., 4, 247-255(1994); Jalink, K., 他: J. Cell Biol., 126, 801-810(1994); 及びTigyi, G., 他: J. Neurochem., 66, 537-548(1996))。また、神経系株化細胞であるPC12細胞では開口放出を誘導することも報告されている(Shiono, S., 他: Biochem. Biophys. Res Commun., 193, 663-667(1993))。さらに、1996年にChunらによって神経

上皮細胞層(ventricular zone, vz)に特異的に発現するGタンパク質関連受容体遺伝子(ventricular zone gene-1; vwg-1/edg-2)がクローニングされ、当該遺伝子を過剰発現させた細胞の形態変化に血清中の脂質が必要であるという知見から、その特異的リガンドがLPAであることが明らかにされた(Hecht, J. H., 他:J. Cell Biol. 135, 1071-1083(1996))。これらの知見は、神経系におけるLPAシグナリングの重要性を示唆しており、神経の発生や分化においてLPAが重要な役割を演じていると考えられる。

【0006】一方、本発明者らは、以前より真性粘菌Physarum polycephalumを実験材料として、様々な細胞生化学的解析を行っている。真性粘菌は、外部環境の変化に応じて、形態変化を示し、その増殖・分化に伴って、生体膜脂質の組成と代謝に著しい変化を見せることが明らかにされてきた。1992年に単相体ミクソアーバから単離・同定された新規の脂質成分は、構造解析の結果、グリセロール骨格のsn-1位にシクロプロパン環を含むヘキサデカン酸を持ち、sn-2位と3位にリン酸が環状にエステル結合をしている物質であると確認された(Murakami-Murofushi, K., 他: J. Biol. Chem., 267, 21512-21517(1992))。この物質は、Physarum由来のLPA類似体であることから、PHYLPAと命名された(図2を参照)。

【0007】PHYLPAは、真核細胞のDNAポリメラーゼ α の活性を抑え、動物培養細胞の増殖を抑制した脂質画分より得られたものであり、PHYLPAがこれらの生理活性を示すことが確認されている。PHYLPAは特徴的な脂肪酸を有しているが、この脂肪酸部分を別の一般的な脂肪酸に置換した構造類似体を有機合成し、それらの生理活性を調べた結果、PHYLPAと同様の生理作用が示された(Murakami-Murofushi, K., 他: Biochem. Biophys. Acta, 1258, 57-60(1995))。のことより、これらの生理作用に重要な構造はグリセロールsn-2位、3位の環状リン酸構造にあると推測される。この構造を持つ脂質は、総称して環状ホスファチジン酸(cyclic phosphatidic acid; cPA)と称される(図2を参照)。

【0008】cPAは真性粘菌特有の脂質ではなく、広く生物界に存在していることが確認された。例えば、ヒト血清アルブミン結合脂質より、脂肪酸部分にパルミチン酸(C16:0)を有するcPAが単離・同定され、ミリスチン酸(C14:0)及びステアリン酸(C18:0)が結合したcPAも少量存在することが示唆された。血清中のcPAの濃度は約 10^{-7} Mと予想され、これはLPAの血清中濃度の約1/10に相当する(Kobayashi T., 他: Life Science, 65, 2185-2191(1999))。その後、LPAと同様にヒト血清中やウサギ涙腺液中にもcPAが存在することが確認された(Lilim, K., 他: Am. J. Physiol., 274, C1065-1074(1998))。

【0009】cPAの作用についても、LPAと相反又は類似する生理活性を示すことが報告されている。例えば、細

胞増殖の抑制(Murakami-Murofushi, K., 他: Cell Struct. Funct., 18, 363-370(1993))、癌細胞の浸潤抑制(Mukai, M. 他: Int. J. Cancer, 81, 918-922, 1999)、および細胞内ストレスファイバーの形成(Fischer, D. J., 他: Mol. Pharmacol., 54, 979-988(1998))などが報告されている。

【0010】ところで、加齢に伴うグリア細胞の老化及び機能低下は老人痴呆と密接な関係がある。さらに、最近の知見によれば、年老いた脳では、ニューロンよりも、グリア細胞が著しく減少しており、特にミエリンが損傷、減少しているということが分かってきた。日本で多く見られる脳血管性痴呆である、ビンスワンガー型痴呆では、脳血流が低下して、白質のミエリン鞘が最初にダメージを受けることもわかっている。しかしながら、cPAがグリア細胞に及ぼす作用についてはこれまで報告がなされていない。

【0011】

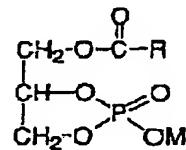
【発明が解決しようとする課題】本発明は、cPAの新しい生理活性の一つとしてグリア細胞への作用を解明し、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進を図ることによってグリア細胞の減少を伴なう神経疾患の治療及び／又は予防に有用な新規な薬剤を提供することを解決すべき課題とした。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために銳意検討した結果、cPAがミエリン形成に主要な役割を担っているオリゴデンドロサイトの増殖及び生存(サバイバル)を促進すること、並びに、cPAがオリゴデンドロサイトに栄養を供給するアストロサイトの生存を促進することによってオリゴデンドロサイトの生存促進に寄与していることを明らかにした。本発明者らはこれらの知見に基づき、cPAがグリア細胞の減少を伴なう神経疾患(例えは、ビンスワンガー型痴呆などの脳血管性痴呆など)の治療及び／又は予防のための薬剤となり得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】即ち、本発明によれば、一般式(I):

【化3】



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を

有効成分として含む、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤が提供される。

【0014】グリア細胞は好ましくは、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞、アストロサイトまたはミクログリアから選択される細胞であり、特に好ましくは、オリゴデンドロサイト又はアストロサイトから選択される細胞である。

【0015】本発明の別の側面によれば、上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む、グリア細胞の減少に起因する神経疾患の治療及び／又は予防のための薬剤が提供される。グリア細胞の減少を伴なう神経疾患は、例えば、脳血管性痴呆であり、その具体例としては、ビンスワンガー型痴呆が挙げられる。一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体は特に好ましくは、1-オレオイル環状ホスファチジン酸である。

【0016】本発明のさらに別の側面によれば、治療的有効量の上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存を促進する方法；並びに、治療的有効量の上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、グリア細胞の減少に起因する神経疾患を治療及び／又は予防する方法；が提供される。

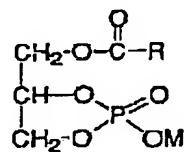
【0017】本発明のさらに別の側面によれば、上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体の、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存のための薬剤の製造における使用；並びに、上記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体の、グリア細胞の減少に起因する神経疾患の治療及び／又は予防のための薬剤の製造における使用；が提供される。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本発明の薬剤は、グリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進、並びにグリア細胞の減少に起因する神経疾患の治療及び／又は予防のために使用することができ、下記一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体を有効成分として含む。

【0019】

【化4】



【0020】(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアル

カン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

【0021】一般式(I)において、置換基Rが示す炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ベンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ペントデシル基、オクタデシル基などが挙げられる。

【0022】置換基Rが示す炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基の具体例としては、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などが挙げられ、より具体的には、8-デセニル基、8-ウンデセニル基、8-ドデセニル基、8-トリデセニル基、8-テトラデセニル基、8-ペントデセニル基、8-ヘキサデセニル基、8-ヘptaデセニル基、8-オクタデセニル基、8-イコセニル基、8-ドコセニル基、ヘプタデカ-8, 11-ジエニル基、ヘptaデカ-8, 11, 14-トリエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13, 16-ペントエニル基、ノナデカ-4, 7, 10, 13, 16-ペントエニル基、ヘニコサ-3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサエニル基などが挙げられる。

【0023】置換基Rが示す炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例としては、例えば、8-デシニル基、8-ウンデシニル基、8-ドデシニル基、8-トリデシニル基、8-テトラデシニル基、8-ペントデシニル基、8-ヘキサデシニル基、8-ヘptaデシニル基、8-オクタデシニル基、8-イコシニル基、8-ドコシニル基、ヘptaデカ-8, 11-ジイニル基などが挙げられる。

【0024】上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロベントン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N-メチルプロリジン環などが挙げられる。上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。

【0025】従って、置換基Rがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、8, 9-メタノペントデシル基などが挙げられる。置換基Rが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ベンジル基、フェネチル基、p-ペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。

【0026】一般式(I)で示される環状ホスファチジン酸(cPA)誘導体中のMは、水素原子又は対カチオンである。Mが対カチオンである場合の例としては、例えば、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子、置換若しくは無置換アンモニウム基が挙げられる。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、アルカリ土類金属原子としては、例えば、マグネシウム、カルシウムなどが挙げられる。置換アンモニウム基としては、例えば、ブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などが挙げられる。本発明で用いられる一般式(I)で示されるcPAの具体例としては、オレオイルcPAが特に好ましい。

【0027】一般式(I)で示されるcPA誘導体は、例えば、特開平5-230088号公報、特開平7-149772号公報、特開平7-258278号公報、特開平9-25235号公報に記載の方法等に準じて化学的に合成することができる。あるいは、一般式(I)で示されるcPA誘導体は、特願平11-367032号明細書に記載の方法に準じてリゾ型リン脂質にホスホリパーゼDを作用させることによって合成することもできる。ここで用いるリゾ型リン脂質は、ホスホリパーゼDを作用しるリゾ型リン脂質であれば特に限定されない。リゾ型リン脂質は多くの種類が知られており、脂肪酸種が異なるもの、エーテル又はビニルエーテル結合をもった分子種などが知られており、これらは市販品として入手可能である。ホスホリパーゼDとしては、キャベツや落花生などの高等植物由来のものや*Streptomyces chromofuscus*, *Actinomadula* sp.などの微生物由来のものが市販試薬として入手可能であるが、*Actinomadula* sp. No.362由来の酵素によって極めて選択的にcPAが合成される（特開平11-367032号明細書）。リゾ型リン脂質とホスホリパーゼDとの反応は、酵素が活性を発現できる条件であれば特に限定されないが、例えば、塩化カルシウムを含有する酢酸緩衝液(pH5~6程度)中で室温から加温下(好ましくは37°C程度)で1から5時間程度反応させることにより行う。生成したcPA誘導体は、常法に準じて、抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー(TLC)などにより精製することができる。

【0028】次に、本発明の薬剤の作用の標的となるグリア細胞について説明する。神経細胞の活動や維持を助けるグリア細胞の加齢に伴う老化、機能低下は老人痴呆と密接な関係がある。年老いた脳では、グリア細胞が著しく減少しており、特にミエリンの損傷、減少が著しい。中枢神経系において、このミエリン形成の主要な役割を担っているのがオリゴデンドロサイトである。正常脳と老齢脳におけるオリゴデンドロサイトの細胞系譜と、その機能異常の解明は、単に軸索再生の鍵を握るのみでなく損傷を受けた神経細胞の機能回復にもつなが

る。

【0029】機能異常解明の一環として、後記する実施例では、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトへの機能性リン脂質cPAの作用の解明、細胞内応答のメカニズムの解明を試み、オリゴデンドロサイト及びアストロサイトの増殖並びに分化と、ミエリン形成能の解明に焦点を当て、脳神経障害や老人性痴呆などの脳疾患に対する修復法及び予防法を開発することを目指した。

【0030】初めに、脳神経細胞の構成、分化、機能等について、図を参照しながら説明する。脳神経は図3に示すように様々な細胞が組み合わさせて高次機能を発現している。グリア細胞は神経上皮細胞から分化しており、神経細胞よりはるかに数が多く神経細胞の活動、維持を助けている。高等動物ではニューロンやグリアの前駆細胞は、多分化能を残したまま周囲の状況により、ニューロンに分化したり、グリアに分化したりする。図4はその分化を示すものである。

【0031】アストロサイトには図4に示されるように放射状グリアを経るものとそうでないものとがある。0-2A前駆細胞を血清存在下におくとアストロサイトに分化させることができる。アストロサイトは、オリゴデンドロサイトやニューロンなどの神経細胞にエネルギーを供給する働きをしている。例えば、0-2A前駆細胞に対して働いているPDGFやbFGF等の成長因子は、アストロサイトから分泌されている。アストロサイトの細胞は、表面抗体として、グリア線維性酸性蛋白質(GFAP)及びA2B5の蛋白質を発現している。GFAPは、アストロサイトに特異的なので、アストロサイトの細胞染色の際にはこれを指標として用いる。オリゴデンドロサイトは0-2A前駆細胞から分化する。0-2A前駆細胞は表面抗体としてA2B5を有しており、アストロサイトから分泌されるPDGF、bFGFなどの成長因子に反応して増殖する。この細胞を無血清状態に置くことでオリゴデンドロサイトに分化させることができる。

【0032】図5に示すように、オリゴデンドロサイト(OL)はその分化段階によって、様々な特異的なタンパク質を発現している。また、それぞれの分化段階によってやはりPDGF、bFGFが特異的に働く。成熟したオリゴデンドロサイトになると、メッシュ状の突起を軸索に向かって伸ばし、軸索に巻きついてミエリン鞘を形成する。

【0033】本発明のグリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤は、ミエリン鞘形成に主要な役割を果たしているオリゴデンドロサイトの生存を促進することにより、神経細胞を保護して、その生存の促進に寄与することができ、それによって老人性痴呆などの脳血管性痴呆等による脳神経障害を治療できる。さらには、上記のような作用により、損傷を受けた神経細胞の機能回復に寄与することができる。本発明のグリア細胞の増殖、分化及び／又は生存の促進のための薬剤は、上記作用によって、ミエリン形成担当細胞の生存を促進す

ことにより、脳への栄養供給を促進し、脳の老化を予防することができる。

【0034】本発明の薬剤は、1又は2以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である一般式(I)で示されるcPA誘導体とを含む医薬組成物の形態で提供することができる。

【0035】本発明の薬剤は、種々の形態で投与することができるが、主な作用部位が脳であるため、血液-脳閻門を通過できる形態であることが好ましい。そのような好適な投与形態としては、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の薬剤の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。

【0036】本発明の薬剤の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、溶解剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的な成分は当業者に周知されている。

【0037】経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

【0038】注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成する溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

【0039】本発明の薬剤はヒトを含む哺乳動物に投与することができる。本発明の薬剤の投与量は患者の年

齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として1 μ g/k gから1,000mg/k g程度の範囲であり、好ましくは10 μ g/k gから100mg/k g程度の範囲である。上記投与量の薬剤は一日一回に投与してもよいし、数回（例えれば、2～4回程度）に分けて投与してもよい。

【0040】本発明の薬剤は、神経障害の治療又は予防に有効な他の薬剤、脳神経にエネルギーを供給するような栄養剤等と併用することもできる。なお、cPAそれ自体は、後記する実施例1の結果から明らかなように哺乳類の脳に存在する物質であり、生体にとって安全であると考えられる。以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

【0041】

【実施例】実施例1：ホスホリバーゼD（PLD）によるcPAの生合成。

実施例1では、放線菌由来PLDを用いてリゾホスファチジルコリン（LPC）からcPAを生成できること、並びに哺乳類の脳中にcPAを生成する酵素が存在することを明らかにした。

（A）材料及び方法

（A-1）実験材料

放線菌*Streptomyces chromofuscus* (*S. chromofuscus*)由来のPLD、キャベツ由来のPLDは、Sigma社より購入した。Actinomadura sp. No. 362(A. sp. No. 362)由來のPLDは、名糖産業より購入した。1-オレオイルLPC (1-o leoyl LPC)、リゾホスファチジルセリン (lysophosphatidylserine; LPS)は、Avanti Polar Lipid, INC.社より購入し、リゾホスファチジルエタノールアミン (lyso phosphatidylethanolamine; LPE)は、Doosan Serdary Res. Lad.社より、1-アルキルリゾホスファチジルコリン (1-alkyl lysophosphatidylcholine; 1-alkyl LPC)、1-アルケニルホスファチジルコリン・プラズマロゲン (1-alkenyl phosphatidylcholine plasmalogen; 1-alkenyl LPC)は、Sigma社より購入した。また、K obayashi, S.,他: Tetrahedron Lett., 34, 4047-4050 (1993)に記載の方法に準じて有機合成したオレオイルcPA (oleoyl cPA) も使用した。

【0042】（A-2）1-NBD-LPCの合成

cPA生成活性測定の為の基質として、蛍光標識されたLPCの調製を行った。すなわち、1-ヘキサデカノイル-2-(12-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル))-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (2-NBD-HPC; Avanti Polar lipids, INC.社製)を出発原料とし、リバーゼ (*Rhizopus delemere*由来; 生化学工業社製)で1位の脂肪酸のみを脱アシル化した後、トリス塩酸バッファー (pH=9) 中で、2位の蛍光アシル基を1位に転位させ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

C)を用いて精製したものを1-NBD-LPCとした。

【0043】(A-3) cPA生成活性測定

基質として、1-NBD-LPCと卵黄由來のLPCを1:99で混ぜ合わせたものを使用した(1% NBD-LPC)。100 μ M 1%NBD-LPC存在下、10mM塩化カルシウムを含む100mM酢酸バッファー(pH=5.6)中で酵素アッセイを行った。酵素源として、放線菌S.chromofuscus由來のPLD2.2 μ g/ml、または、放線菌A.sp. No.362由來のPLD1.4 μ g/mlを用いた。反応は30°C(S.chromofuscusの場合)または、37°C(A.sp.No.362の場合)で行った。反応終了時に反応液の0.3倍容の0.1Mクエン酸を加えて、溶液を酸性にした後に、クロロホルム：メタノール(2:1)混液を反応液の5.4倍量加え、遠心(1,400×g、5分)して下層に、脂質を抽出した。もう一度、クロロホルム：メタノール(2:1)混液抽出操作を同様に繰り返した後に、下層を合わせて窒素気流下で濃縮・乾固させた。得られた脂質を少量のクロロホルム：メタノール(2:1)混液に再溶解させて、シリカゲル(Silica Gel) 60F薄層クロマトグラフィーブレート(TLC; E.Merck社製)にスポットし、展開溶媒；クロロホルム/メタノール/酢酸/5%二亜硫酸ナトリウム水溶液(100:40:12:5)で脂質を分離し、各蛍光スポットの強さを、蛍光イメージ分析器(fluoroimage analyzer) FL A-2000(富士フィルム社製)で定量分析した。

【0044】(A-4) ESI-MS/MSによる構造解析

エレクトロスプレー型イオン源をタンデム四重極型質量分析計に装備したクアットロII(Quattro II; Micromass社製)とHPLCを連結した装置を使用して、陰イオンモードで分析した。ヒューレットパッカードモデル(Hewlett Packerd model) 1050 HPLCポンプ(Hewlett Packerd社製)を用いて、アセトニトリル/メタノール(1:1)混液により5 μ l/分の流速で溶出した。サンプルは、0.1%ギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル/メタノール(1:1)混液中に10~50pmol/ μ lの濃度になるように脂質を溶かしたものを、3~5 μ l注入した。ギ酸とアンモニアは、サンプルがイオン化される時に、それぞれプロトンの供与体、受容体として働く。HPLCとMSのインターフェイスは80°Cに維持し、溶媒を蒸発させる窒素ガスは圧力40psi、流速0.4 l/分に設定した。MS分析においてcone voltage-30eVで分子イオンを、MS/MS分析においてcone voltage-90eVで脂肪酸を、-170eVでリン酸をモニターした。MS/MS分析の際には、不活性ガスを導入して局部的に高圧な部位を作り、分子イオンを衝突活性開裂(collision induced dissociation; CID)させてドーターイオンを発生させる手法を組み合わせた。衝突ガス(collision gas)にはアルゴン(圧力3.0~4.5e-4Torr)を用い、衝突エネルギー(collision energy)は-50eVに設定した。

【0045】(A-5) NIH-3T3における各種リゾリン脂質の添加によるストレスファイバーの形成

マウス由来縫維芽細胞NIH-3T3は、10%のウシ胎児血清

(fetal bovine serum; FBS; Moregate社製)を含むダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM)で培養しているものを実験に用いた。NIH-3T3を22mm径のカバーガラスを敷き詰めたシャーレ(10cm径)中に2.5×10⁴細胞で植え継ぎ、24時間後にFBSを含まない培地に変え、その後48時間血清飢餓状態で培養した。10 μ Mのリゾリン脂質を加え、37°C、30分間インキュベートすることで細胞に刺激を与えた後に、3.7%パラホルムアルデヒドと0.1%トリトン(Triton)X-100を含むダルベッコのPBS(Dulbecco's PBS)で室温にて、10分間固定した。その後、5単位/mlのローダミンファロイジン(rhodamine phalloidin; ナコシ社製)で37°C、1時間染色した。カバーガラスをPBSで3回洗浄した後に、共焦点レーザー顕微鏡TCS NTレーザー制御走査型顕微鏡(Control Laser Scanning Microscope; Leica社製)で観察した。

【0046】(A-6) ラット脳中のcPA生成活性の測定

材料として、雄4週齢のスプラグードーリ系ラット(Sprague-Dawley rat)を用いた。ラットはエーテル麻酔をかけた後、断頭し、全脳を摘出し、-80°Cで保存した。保存してあつたラット全脳の左右いずれかの半分(約0.8g)に、10倍量の0.32Mショ糖液を加え、ポリトリオノホモジナイザー(Polytron Homogenizer; Polytron社製)、パワーコントロール(power control)7で、20秒間2回ホモジナイズした。この液の体積の2倍量のヘペスバッファー(Hepes buffer)を加え、ホモジネート溶液とした。cPA生成活性の測定は、以下の溶液組成で行った。すなわち、基質として1%NBD-LPC 40nmolまたは、1位脂肪酸のカルボキシル基の炭素を放射標識した¹⁴C-LPCと非標識のLPCを2:55の比率で混ぜたもの(120nCi)を用い、オレイン酸ナトリウム450 μ M存在下のホモジネート溶液100 μ l中37°Cで反応させた。反応終了後の処理については、放線菌PLDアッセイの条件に準じた。

【0047】(B) 結果

(B-1) 放線菌PLDによるLPA/cPAの生成

1%NBD-LPCを基質として、リン酸基転位活性の強弱の異なる2種類の放線菌由來のPLDを用いてcPAの生成が見られるか否かを検討した。S.chromofuscus由來のPLDを用いた場合、20分間反応させると、主な生成物として1-NBD-LPAのみが得られた。しかし、リン酸基転移活性が高いとされているA.sp.362由來のPLDを用いると、LPAとは異なった生成物が主に得られ、この化合物のRf値は、有機合成したcPA標準品(オレオイルcPA)と一致した。これらの反応の違いを確認するため、それぞれの酵素の濃度依存性、さらに反応の時間依存性を検討した。S.chromofuscus由來のPLDを用いた場合は、基質であるLPCが減少するのに伴って、LPAの生成のみが見られた。それに對し、A.sp.362由來のPLDを用いた場合には、cPAに相当する生成物の増加が見られたのみで、LPAの生成はほと

んど見られなかった。このことは、PLDの種類によつて、基質が同じであっても生成物が異なることを示している。また、酵素学的解析の進んでいるキャベツ由來のPLDを用いたときには、LPAとcPAの両方が約6:4の割合で生成した。

【0048】ここで、cPA相当の化合物を生成するA.sp.362由來の酵素について、さらに基質特異性を調べてみた。基質として各100 μ Mの1-acyl LPC、1-alkyl LPC、1-alkenyl LPC、LPS、LPEを用い、標準的なPLDアッセイ条件に準じて反応を行わせた。それぞれの基質からの生成物をTLCを用いて分離し、LPA、cPA相当のスポットをかきとり、リン定量を行って、生成量を測定した。いずれの基質においてもLPAの生成はほとんど見られなかつた。LPC、1-alkyl LPC、あるいは1-alkenyl LPCを基質として用いた場合には、時間依存的にcPAが生成したが、LPS、LPEを基質として用いた場合にはcPAは生成されなかつた。この結果より、A.sp.362由來PLDは、極性基部分にコリン(choline)を有するリゾリン脂質から効率よくcPAを生成することが示された。また、alkyl、alkenyl型LPCもcPA生成の基質になりうることがわかつた。

【0049】(B-2) A.sp.362由來PLD反応生成物の構造解析

1位脂肪酸にオレイン酸を持つ1-oleoyl LPCを基質としてA.sp.362由來PLDで反応させたときの主生成物(cPA)と同じRf値を持つ化合物について、その構造解析を行う為、質量分析を用いた。まず、質量分析の条件を設定するため、スタンダードとして有機合成した1-oleoyl cPAをESI-MS/MSにかけ、陰イオンモードで分析した。その結果、上記した条件で、1-oleoyl cPAの分子イオン[M-H]⁻に合致するm/z 417のピークが観察された。同一条件下でPLD反応生成物について分析したところ、同様にm/z 417のピークが強く観察された。分子イオンに相当するピーク群について、さらに構造情報を得るため、in-source fragmentationによるタンデムマススペクトリー(MS/MS)を行った。スタンダードcPAの分子イオンm/z 417を親イオンとしたドータースキヤンの結果、いくつかの特徴的イオンピークが発生し、以下のように解釈された。すなわち、m/z 281はC₁₇H₃₃COO⁻、m/z 153は[M-C₁₇H₃₃CO]⁻、m/z 79はPO₃⁻に相当する。一方、PLD反応によって得られたm/z 417ピークについて同様にMS/MS分析をした結果、同一の特徴的なフラグメントピーク群が認められた。以上より、A.sp.362由來PLD反応によって作られた化合物がcPAであることが確認された。

【0050】(B-3) PLD反応生成物によるNIH-3T3細胞でのストレスファイバーの形成

放線菌A.sp.362由來PLD反応で得られた生成物がcPAと同一の化合物であることを更に確認するために、その生物活性を検討した。すなわち、cPAの持つ生理活性の1つである、纖維芽細胞でのアクチнстレスファイバーの

形成能を調べた。血清飢餓状態にしたサブコンフルエント(subconfluent)状態の、マウス由來纖維芽細胞株であるNIH-3T3に10 μ MのLPA、化学合成されたPHYLPA、あるいはPLD反応生成物であるcPAをそれぞれ37°Cで30分間与え、ローダミンファロイジンでアクチンのストレスファイバーを染色し、観察を行つた。脂質を添加しなかつたコントロールの細胞では、ストレスファイバーの生成が見られなかつたのに対し、用いた3種のリゾリン脂質でいずれもストレスファイバーの形成が見られた。

【0051】(B-4) ラット脳におけるcPAの生成
ラット脳中にcPA生成活性があるか否かを検討した。異なる複数の条件下で検討を行つた結果、最終的にショ糖水溶液(0.32M)でホモジネートを作成し、20 mMヘペスバッファー(pH 7.2)中、オレイン酸(450 μ M)存在下で活性の測定を行つたところ、37°Cで60分間インキュベーション後、cPA相当のスポットが確認された。

【0052】(C)まとめ

上記結果より、PLDと総称されるリン脂質加水分解酵素のうちの特定の酵素によってcPAを生成できることが示された。現在精製品として市販されているPLDの中でも、その酵素源が異なると、LPCを基質にした場合、異なる生成物が得られることがわかつた。実施例1において、ラット脳ホモジネート中にLPCからcPAを生成する酵素活性が検出できたことは、ホスファチジル基転移反応が、生理活性脂質であるcPAの産出に積極的に貢献していることを示している。哺乳類の脳の中には、cPAが存在することが示され、また、PLD活性についても脳は比較的高い活性を有することが分かった。基質のLPCは、通常の生理活性条件下では脳内にほとんど検出されないが、ある種のPLA₂の活性化を経て生成されると考えられる。

【0053】放線菌A.sp.362由來PLDを用いることにより、効率よくcPAが調製できることはcPAの構造類似体を作成する上で有用である。このような酵素を用いた調製法では、1-alkenyl LPCからcPAを調製することが可能である。1-alkenyl LPAはウサギ角膜損傷時に検出され、細胞増殖活性を有し、創傷の治癒に関与していることが考えられている。この他、脂肪酸の異なったLPCから、対応するLPA/cPAを調製することが可能である。

【0054】実施例2：オリゴデンドロサイトの初代培養の確立

未成熟のオリゴデンドロサイトを成熟させるためには、アストロサイトとの直接接觸による共培養が必要である。アストロサイトとの共培養を経て分化しミエリン形成担当細胞へと成熟することができる。ニューロンと共に培養しても未成熟のままである。また、オリゴデンドロサイトは非常に不均一な集団を形成する細胞であるため、培養では前駆細胞の大量調製法が大きな焦点となる。これらを考慮して、先ずオリゴデンドロサイトの培養法を以下の通り確立した。

(1) 培養液、試薬の調製

(i) MEM⁺(血清を添加していないもの)

粉末のイーグルMEM培地4.7gを純水に溶解し、121°Cのオートクレーブで15分間高圧滅菌し、室温まで冷却する。ここに40g/mlグルコース5.0ml、2.92g/100ml L-グルタミン 5.0ml(-20°C冷蔵庫で保存)を加える。pHが7.4~7.6になるようにNaHCO₃を加えてpH調整をしたもの、4°C冷蔵庫で保存した。

(ii) MEM⁺(血清を添加したもの)

MEM⁺に10%濃度になるようウシ胎児血清(FBS)を加えたものを4°C冷蔵庫で保存した。

(iii) PBS-

ダルベッコPBS(ー)粉末4.8gを純水に溶解し、121°Cのオートクレーブで15分間高圧滅菌し、室温まで冷却したもの、4°C冷蔵庫で保存した。

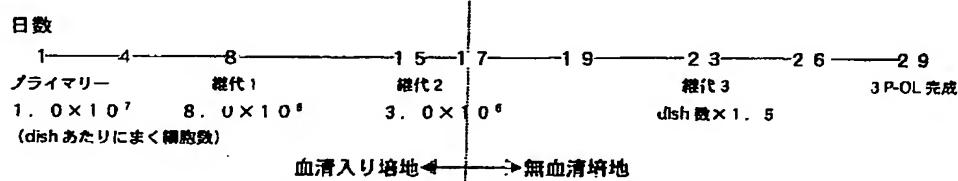
(iv) B.S medium(無血清培養液)を4°C冷蔵庫で保存した。

【0055】(2) 前日の準備

0.02mg/mlのポリ-L-リジン(PLL)溶液を1ディッシュ(10cm)当たり約3ml添加し、クリーンベンチ内に静置した。当日にPLLコートを行う際は同様にディッシュに添加した後インキュベーターに15h30分程度入れた。当日は細胞を播ぐ前にディッシュを純水で2回洗浄した。

【0056】(3) 実験手順

妊娠18日齢(18E)の母ラット(E18Wister Rat)を適量のジエチルエーテル入りの麻酔瓶の中に入れて麻酔をかけた。麻酔時間は3~5分とし、死亡する直前で止めた。母ラットを麻酔瓶から取り出し、適當なバットの上に仰向けにして下腹部をエタノールで消毒した。尾から3~4cm付近にはさみで切れ目を入れ、この切れ目からはさみを挿入して横に開き皮と内膜を分離させた。また、皮の部分を切り開き内膜を露出させる。内膜が露出したら再びエタノールで消毒をし、内膜を切り開いて子宮を取り出した。子宮を持ち上げながらY字になっている部分を切り、子宮を取り出した。胎児脳へのダメージを減らすため、取り出した子宮は冷却したMEM⁺へ入れた。



*赤い数字の日→ MEM⁺でメディウムチェンジ

*青い数字の日→ B.S.でメディウムチェンジ

【0057】これ以下の作業は全て無菌室のクリーンベンチ内で行った。胎児は子宮の二重の膜に包まれているので、その中から取り出し、冷却MEM⁺に入れた。ピンセットで胎児をつかみ、頭部を切開した。まず、口の部分をハサミで横に切り、次に口から顔面の中央を額に向かって真っ直ぐ深くハサミを入れ、さらに、耳の方向に向かってY字に切った。先の尖ったピンセットで頭皮、頭蓋骨をはずし、脳が剥き出しにならビンセットですくい出し、新しいMEM⁺に入れた。

【0058】取り出した脳を、臭覚領域を左において、ピンセットで右方向に向かって髄膜を剥がした。次に、脳を裏返して、裏側についている余分なものを取り除いた。最後にもう一度血管を全て取り除いた。

【0059】ディスパーゼ(disperse) I (3U/ml)を2ml添加した35mmディッシュに大脳皮質を丸型ピンセットでつまみ入れた。37°CでCO₂5%、湿度95%のインキュベーター中に5分間置いた。そこに、DNase(1ml)を加え、再び10分間インキュベーター中に置いた。先をあぶって丸くしたバストールピペットを使って、泡立てないように注意しながら十分ビベッティングし、細胞をさらさらの状態にする。50mlチューブの上に70μmのメッシュを載せ、適量のMEM⁺でメッシュを湿らせた。細胞懸濁液をメッシュを通してチューブ中に注ぎ、次いで、MEM⁺を2ml程度注ぎ、メッシュを洗った。メッシュを外し、MEM⁺で30~40mlにメスアップした。得られた試料を1000r.p.mで5分間遠心し、上清を取り除き、再びMEM⁺で30~40mlにメスアップし、ビベッティングをして再度1000r.p.mで遠心した。上清を取り除き、今度はMEM⁺を30ml加え、十分ビベッティングし、セルカウンターで細胞数をカウントした。PLLコートしたディッシュに1ディッシュ当たりの細胞数が 1.0×10^7 になるように細胞懸濁液を播いた。最終液量がディッシュ当たり10mlになるようにMEM⁺を加えて調整し、インキュベーター中に培養した。以後は以下の表に示す日程に従って、培地交換と継代を行った。

【0060】

【表1】

【0061】なお、培地交換、継代は以下の通り行つた。

4:1日: MEM⁺でメディウムチェンジ
17日目以降: B.S.(無血清培地)で
メディウムチェンジ
総代もB.S.で行う。

(培地交換) ディッシュの培養液を捨て、PBS(-)3ml程度で2回洗い、新しい培養液を10ml注ぐ。17日目からの培地交換はB.S(無血清培地)を用いて行う。また、1回目の培地交換の時のみ1ディッシュ当たり200μlのbFGFを加える。これは0-2A前駆細胞を増やすためである。

(継代) 5ml程度のPBS(-)でディッシュを2回洗う。1回目の継代のときには、2回目にPBS(-)を注いだ後、2~3分そのままにしておく。0.05%トリプシンを2~3ml加え、8分間37°Cインキュベーターに静置する。顕微鏡で細胞の様子を観察した後、トリプシンは捨てずに、MEM⁺をトリプシンと同量加えてビベッティングし、トリプシンの働きを止める。1000r.p.m.で5分間遠心し、上清を捨てた後、MEM⁺を20~30ml加えて再度ビベッティングし、1000r.p.m.で遠心する。セルカウンターで細胞数をカウントする。上清を捨てMEM⁺(3回目の継代のときはB.S)を20~30ml加えてビベッティングしセルカウンターで細胞数をカウントする。それぞれの継代の段階に応じ、以下の数でディッシュに細胞を播きインキュベーター内で静置培養する。

1回目: 8.0×10^6

2回目: 3.0×10^6

3回目: ディッシュ×1.5 (細胞数)

【0062】(4) 実験結果

図6に上記の培養の概要と、実際に培養を行った結果を併せて示す。最初の1週間は、0-2A前駆細胞、プロオリゴ денドロサイト(プロOL)の他に、ニューロン、アストロサイトなど様々な細胞が混在した状態である。しかし、継代にトリプシンを用いることにより、トリプシン感受性の高いニューロンが除去される(図6中、1P-6日目の結果を参照)。この段階すでに成熟しているオリゴデンドロサイト(成熟OL)は、アポトーシスを起こ

して脱落していく。最初はウシ胎児血清(FBS)を添加したMEM培地で培養するが、2回継代した後に、無血清培地(B.S)に切り替えることで、0-2A前駆細胞をオリゴデンドロサイト細胞系譜に導入し、アストロサイトを死滅させていく(図6中、2P-6日目の結果を参照)。上記のようにして、29日目にはほぼ分化段階の揃った、95%以上純粋なオリゴデンドロサイトの培養系を得ることができる(図6中、3P-OLの結果を参照)。

【0063】実施例3:cPA及びLPAのオリゴデンドロサイト培養系細胞への影響

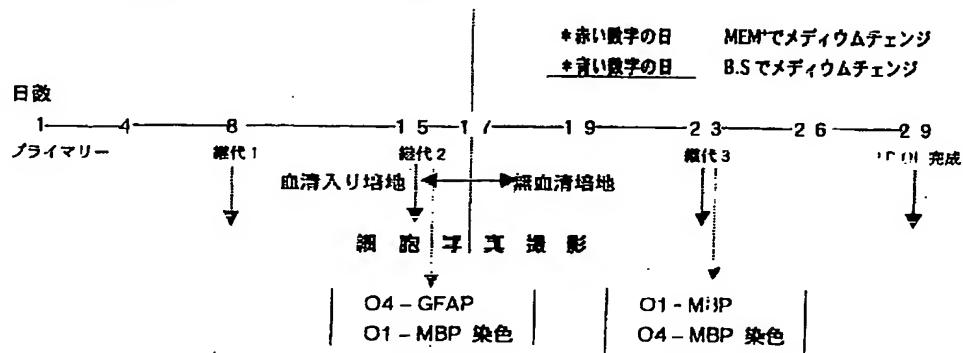
実施例2に記載したオリゴデンドロサイト培養系で、初代培養の段階から、cPA又はLPAを添加する実験を行った。特に、脂質を加えた際に、細胞の生存率(サバイバル)、分化、増殖がどのように変化するかに焦点を当たた。

(1) 実験方法

細胞培養の実験手順は実施例2と同様である。初代培養の段階から、継代、培地交換毎に1ディッシュ当たり5μMになるようにcPA又はLPAを添加した。なお、本試験に用いたcPA誘導体は、実施例1に記載した方法に従って、基質として、オレオイルLPCを使用し、酵素源として、放線菌A.sp.No.362由来のPLDを用いて合成したオレオイルcPAである。培地交換の場合は培養液を交換する際に一緒にcPA又はLPAを添加したが、継代の場合は、継代終了後、インキュベーターで2~3時間静置し、細胞がディッシュに接着するのを確認してから添加した。また、それぞれの段階で、細胞の蛍光染色を行い分化段階特異的発現タンパクをみると、細胞の分化の様子を観察した。下記の表に従って培地交換と継代を行った。

【0064】

【表2】



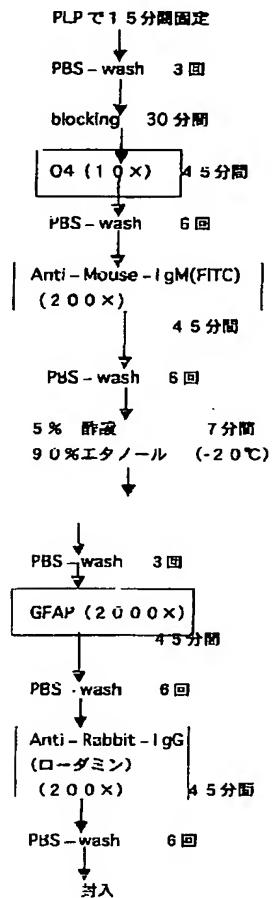
【0065】また、3P-OLは3日毎に細胞の写真撮影、蛍光染色を行った。3P-OLの蛍光染色は表2に記載のものと同じ抗体の組み合わせで行った。次に、蛍光染色の方法を説明する。本試験例の細胞染色に用いた抗体はO1、O4、MBP、GFAPの4種類である。これらの発現タンパクについて、簡単に説明する。

O4: 早期未成熟オリゴの段階から最後までオリゴデンド

ロサイトに発現
O1: 中期未成熟オリゴの段階から最後までオリゴデンドロサイトに発現
MBP(ミエリンベーシックプロテイン): 後期未成熟オリゴの段階から最後までオリゴデンドロサイトに発現(MBPはかなりmatureな段階に近づかないと発現しない。細胞体から突起へと発現が広がっていくため突起の

先端のほうが染まっているほど成熟しているといえる。)
GFAP(glial fibrillary acidic proteins) : グリア線維性酸性タンパク質。成熟アストロサイトに発現する。

O4 - GFAP 二重染色の場合

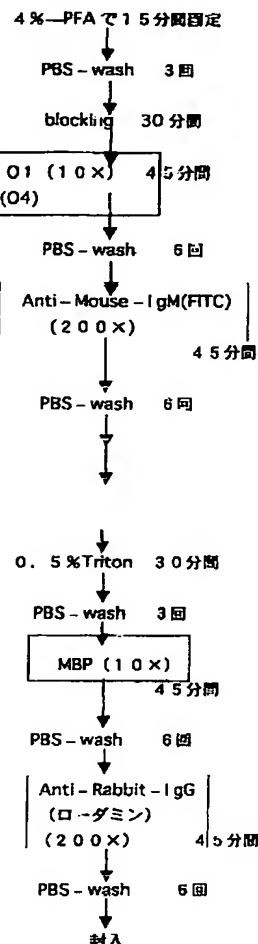


下記表3にO4-GFAP二重染色の場合及びO1(O4)-MBP二重染色の場合の蛍光染色のプロトコールを示す。

【0066】

【表3】

O1(O4) - MBP 二重染色の場合



【0067】染色の際には、スライドガラスを用いた。培養の際、ディッシュの中にPLLコートをしてあるスライドガラスを投入しておき、染色の際には、スライドガラスを取り出して、そこに接着している細胞を染色した。

【0068】(2) 実験結果

初代培養から6日経過後(P-6日目)の培養細胞を図7に示す。コントロール及びLPA添加では、細胞の様子に大きな差は見られないが、cPA添加では、細胞がアグリゲーションを起こし、ニューロンが束化していることがわかる。また、束化したニューロンによってアグリゲートした細胞同士が繋がり合い、コンタクトを取り合っているように見える。

【0069】第1回継代後6日経過後(1P-6日目)の培養細胞を図8に示す。図8中の白い粒々は0-2A前駆細胞であるが、LPA添加のものとcPA添加のもの、特にcPA添加のものでは、コントロールと比べて、この前駆細胞が非常に増加していることがわかる。また、細胞密度もcPA添加のものは他のものと比べて非常に高くなっていることもわかる。

【0070】第2回継代後6日経過後(2P-6日目)の培養細胞を図9に示す。この時にはすでに無血清培地に切り換えた後なので、コントロールではアストロサイトが弱って変形し、細長く伸びてしまっていて、細胞密度もあまり高くない。LPA添加のものも、コントロールほどではないが、やはり細胞密度が低下してきていることが

わかる。これに対し、cPA添加のものは、アストロサイトが依然として元気なままで、細胞密度も以前と変わらず高いままである。

【0071】この段階の細胞の分化の様子を観察するために細胞を染色して蛍光顕微鏡で撮影したものを図10に示す。上段が位相差像(Phase)、中段がオリゴデンドロサイトの抗体である04で染色したもの、下段がアストロサイトの抗体であるGFAPで染色したものである。コントロールではアストロサイトが死滅し、ぼろぼろになっているのがわかる。また、オリゴデンドロサイトの分化もあまり進んでいないため、突起も短い状態である。LPA添加のものでは、まだアストロサイトの組織が確認でき、04染色の写真を見ると、コントロールと比べてオリゴデンドロサイトの突起が長く伸び、細かいメッシュ状になってきており、分化が進んでいることがわかる。cPA添加のものでは、アストロサイトの組織が密に存在していることが確認できる。

【0072】第3回継代後6日経過後(3P-0L)の培養細胞を図11に示す。コントロールでは、余計な細胞は死滅し、殆ど成熟オリゴデンドロサイトのみの状態になっている。これに対し、cPA添加のものでは、細長く変形したアストロサイトが依然として残っている。LPA添加のものでは、アストロサイトは殆ど残っておらず、また、オリゴデンドロサイトの突起がアポトーシスをしてぼろぼろになり始めていることがわかる。この段階のオリゴデンドロサイトの分化の様子を観察するために細胞を染色して蛍光顕微鏡で撮影したものを図12に示す。上段が位相差像、中段がオリゴデンドロサイト抗体04による染色、下段がオリゴデンドロサイト抗体MBPによる染色である。04及びMBPは共にオリゴデンドロサイト抗体であるが、04は早期のオリゴデンドロサイトでも染色できるのに対し、MBPは分化の進んだオリゴデンドロサイトしか染色できない。

【0073】cPA添加、LPA添加のものは、コントロールと比べてMBPの発色が強く、突起の先端の方まできれいに発色している。MBPは細胞体から発現し始め、次第に突起の先端に向かって発現が伸びていくので、突起の先端の方まで染まっているほど分化が進んでいると言える。特に、LPA添加のもので、突起の先端まで染まっていることがわかる。通常の培養では、ここまで段階で実験を終了するが、さらに10日間培養を継続した培養細胞を図13に示す。オリゴデンドロサイトは通常であれば突起が伸びて軸索に巻き付き、ミエリン鞘を形成するが、そうでない場合には、突起の先端の方からアポトーシスを起こしてメッシュ状の突起がぼろぼろになっていく。これは、LPA添加のもので著しく観察され、細胞数自体も減少し、突起がぼろぼろになっていくことがある。これに対し、cPA添加のものでは、この段階になつてもアストロサイトが生存し続け、その周りにあるオリゴデンドロサイトの突起もアポトーシスを起こしてい

ないものが多数観察される。

【0074】(3) 考察

上記実験から、cPAは培養初期に細胞のアグリゲーションやニューロンの束化を引き起こすこと、cPAは培養初期に0-2A前駆細胞の増殖を促進すること、並びにcPAは培養全般を通してアストロサイトの生存(サバイバル)を促進していることが判明した。cPAは、培養初期に、細胞のアグリゲーションやニューロンの束化を引き起こすことが観察されたが、これは、神経細胞間のコンタクトを促進し、神経細胞の維持につながると考えられる。また、cPAは、オリゴデンドロサイトへ分化する0-2A前駆細胞の増殖を促進することで、オリゴデンドロサイトのサバイバルを促進し、ミエリン形成を促進できると考えられる。

【0075】アストロサイトはオリゴデンドロサイトに栄養を供給しているので、このオリゴデンドロサイトのサバイバルの促進にはアストロサイトが大きく関与していることが考えられる。従って、cPAは、アストロサイトのサバイバルを促進することで、オリゴデンドロサイトへの栄養の供給を維持し、それによって、オリゴデンドロサイトのサバイバルが延びていると考えられる。老齢者の脳では、グリア細胞が著しく減少しており、ミエリンが損傷、減少していることが判明している。cPAは、上記のように、ミエリン形成の主要な役割を担当するオリゴデンドロサイトのサバイバルを促進することによって、脳の老化を遅らせ、さらには、損傷を受けた神経細胞の機能回復にも寄与しうると考えられる。

【0076】

【発明の効果】本発明によって、老人性痴呆などのグリア細胞の減少が著しく、特にミエリンの損傷、減少が著しい脳血管性痴呆などにおいて、ミエリン形成の主要な役割を担っているオリゴデンドロサイトの増殖及びサバイバルを促進することにより、損傷を受けた神経細胞の機能を回復することができる脳神経障害治療剤が提供された。本発明によって、神経細胞の活動、維持を助けるグリア細胞の増殖、分化及び/又は生存(サバイバル)を促進できる薬剤が提供され、脳血管性痴呆などのグリア細胞の減少を伴なう神経疾患が提供されるようになった。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ホスファチジン酸(PA)とリゾホスファチジン酸(LPA)の構造を示す図である。

【図2】図2は、リゾリン脂質の構造を示す図である。

【図3】図3は、脳神経細胞の種類とその役割を説明する図である。

【図4】図4は、グリア細胞の分化を説明する図である。

【図5】図5は、オリゴデンドロサイトの分化段階によって発現される種々の特異的タンパク質を説明する図である。

【図6】図6は、オリゴデンドロサイトの初代培養の概要と経過に伴う細胞を示す。

【図7】図7は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による培養開始6日目における細胞を示す。

【図8】図8は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第1回継代後6日目の細胞の写真である。

【図9】図9は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第2回継代後6日目の細胞の写真である。

【図10】図10は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第2回継代後6日目の細胞の染色写真である。

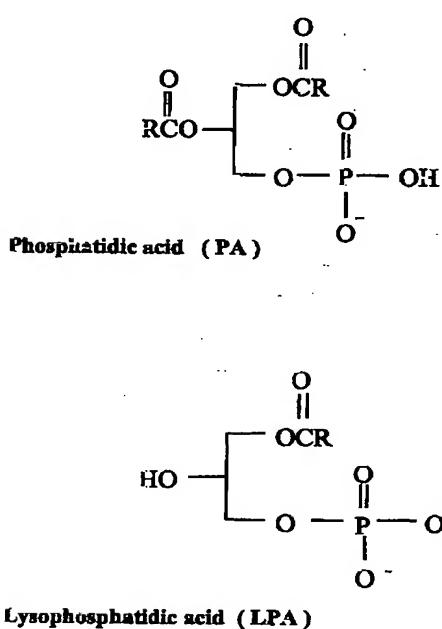
る。

【図11】図11は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第3回継代後6日目(3P-OL)の細胞の写真である。

【図12】図12は、コントロール、cPA添加及びLPA添加による、第3回継代後6日目(3P-OL)の細胞の染色写真である。

【図13】図13は、3P-OL到達からさらに10日後の細胞の写真である。

【図1】



【図2】

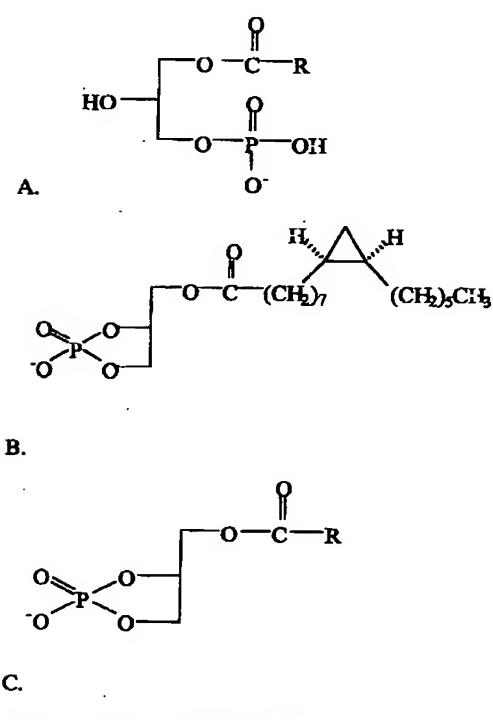
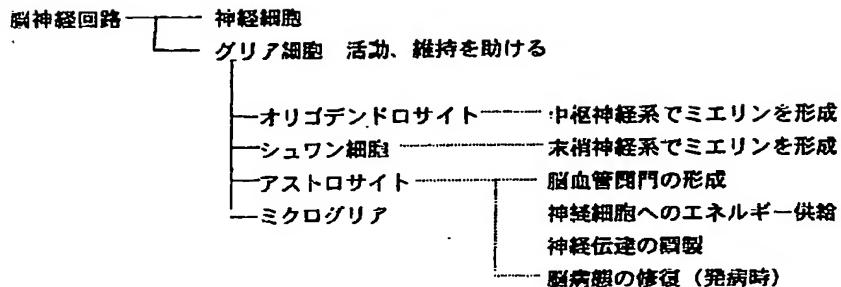


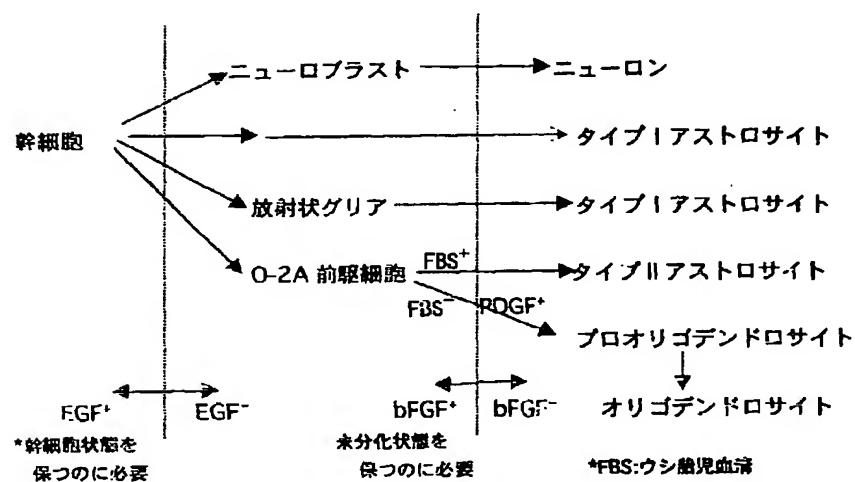
Fig.1 ホスファチジン酸 (PA) と
リゾホスファチジン酸 (LPA) の構造

Fig.2 リゾリン脂質の構造
A. 1-acyl LPA
B. PHYLPA
C. 1-acyl cPA

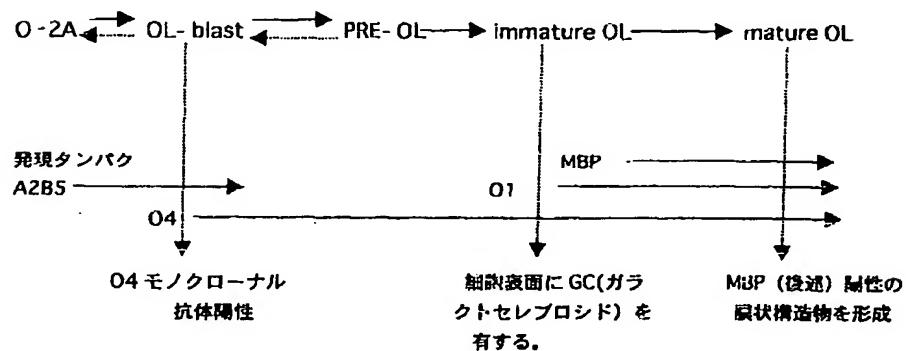
【図3】



【図4】

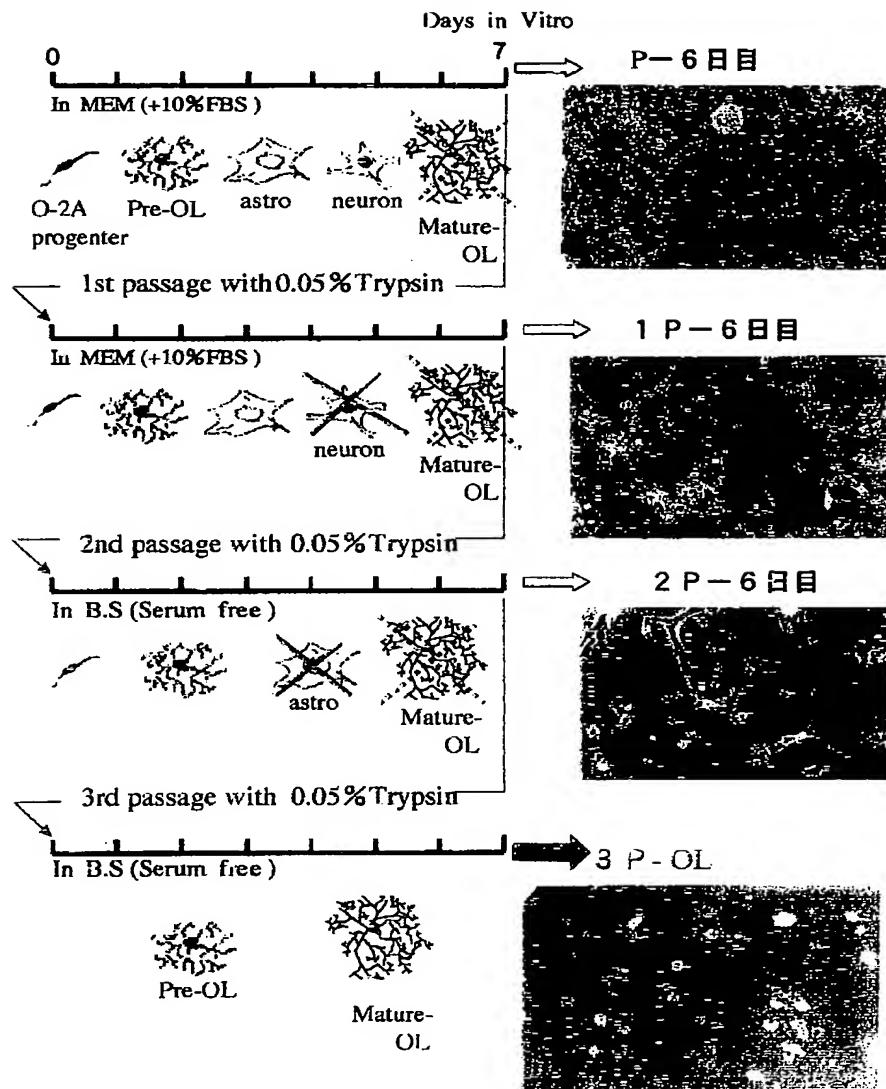


【図5】



【図6】

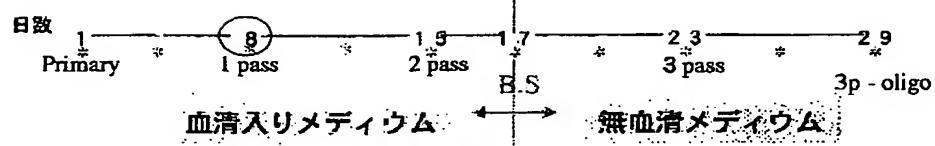
Primary culture from E18 rat brain (Sakurai)



Best Available Copy

【図7】

P - 6日目



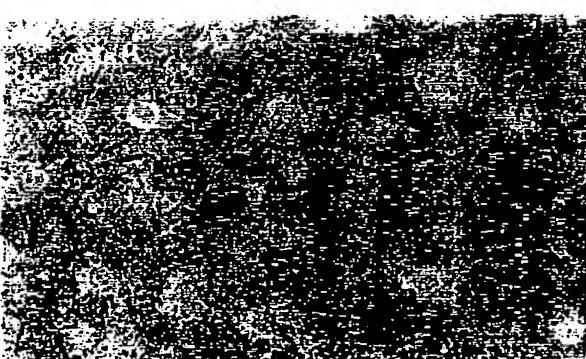
Control



cPA添加

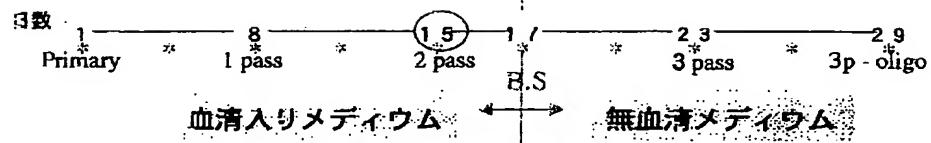


LPA添加



【図8】

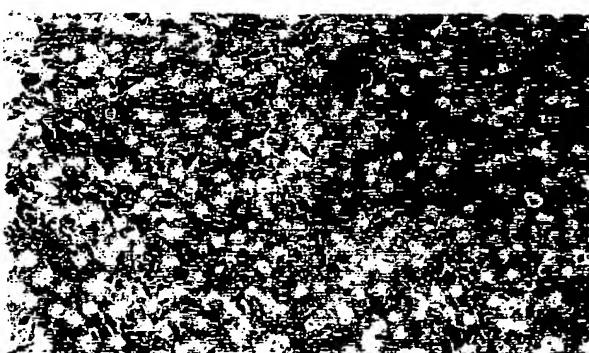
1 P - 6 日目



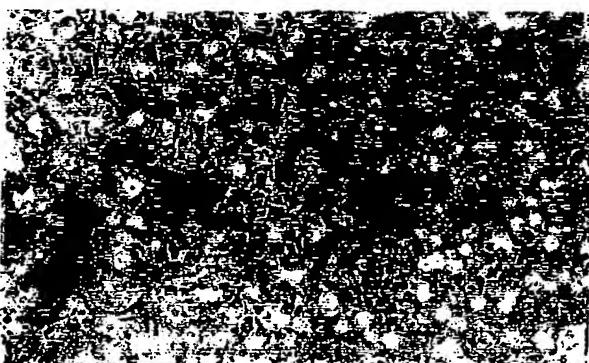
Control



cPA添加



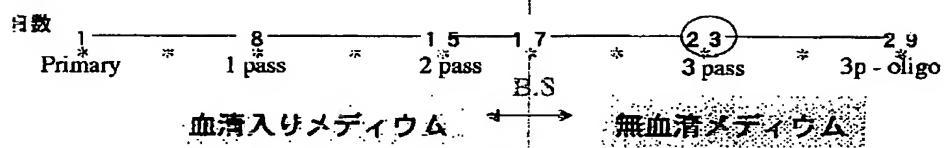
LPA添加



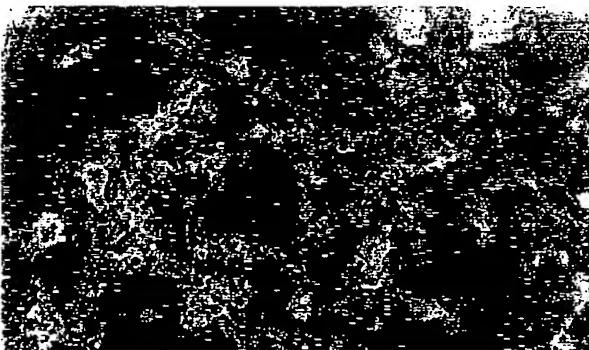
Best Available Copy

【図9】

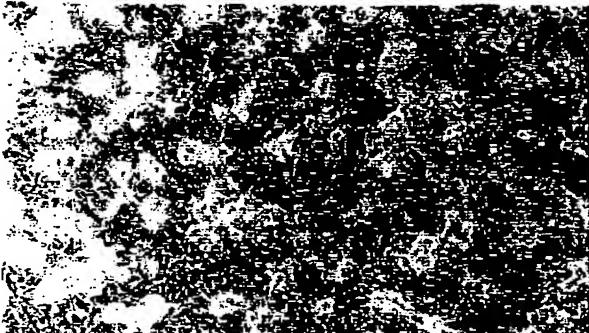
2P - 6日目



Control



cPA添加

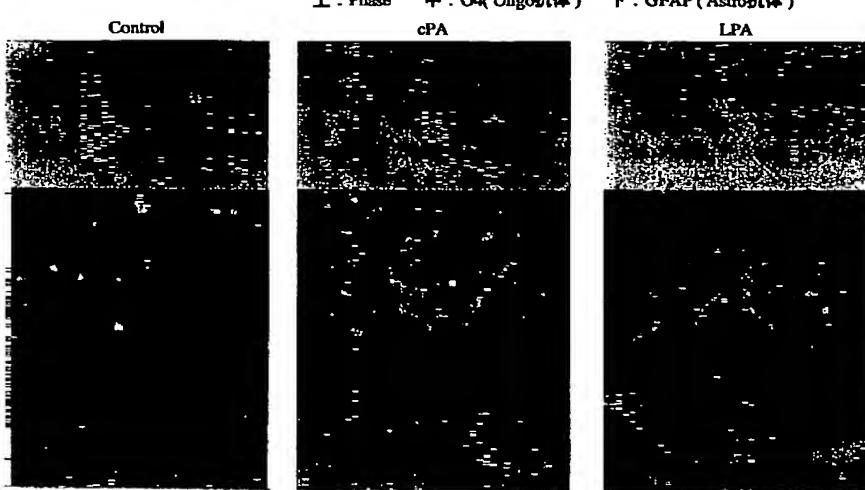


LPA添加



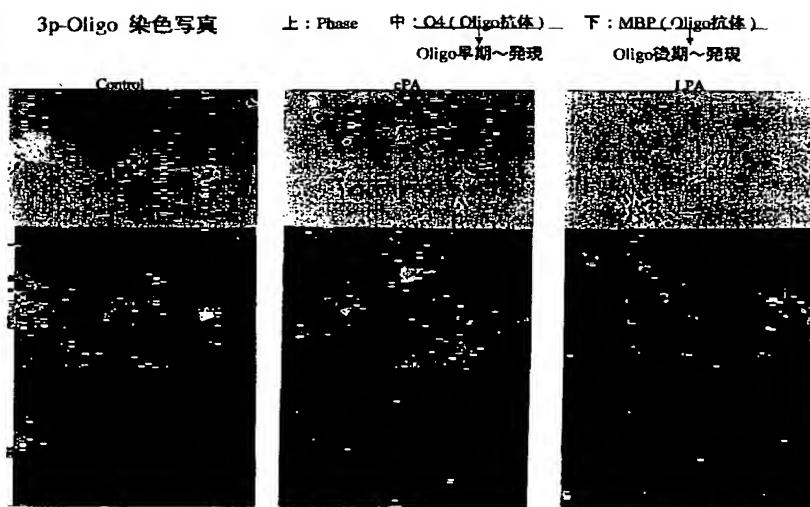
【図10】

2p-6日目 染色写真



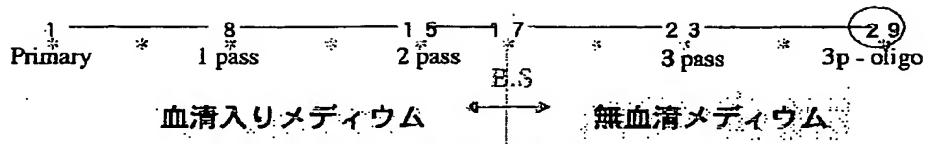
【図12】

3p-Oligo 染色写真

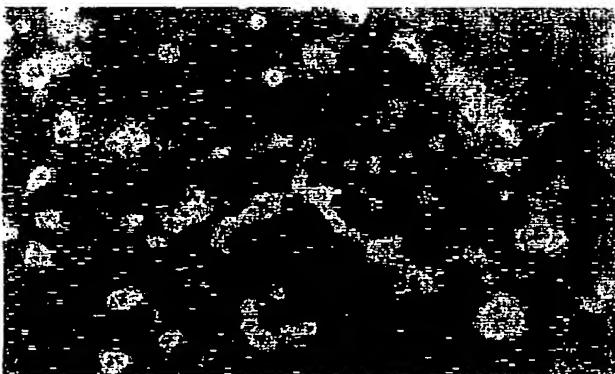


【図11】

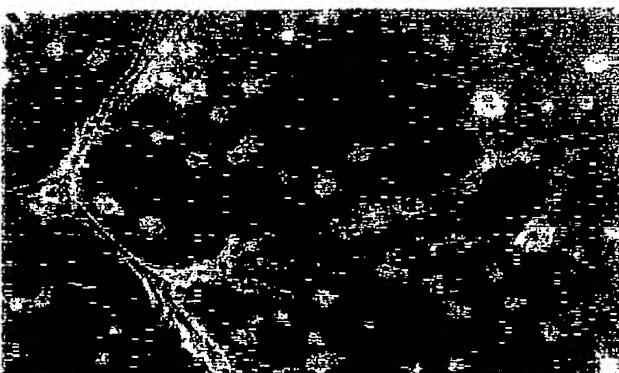
3P - Oligo



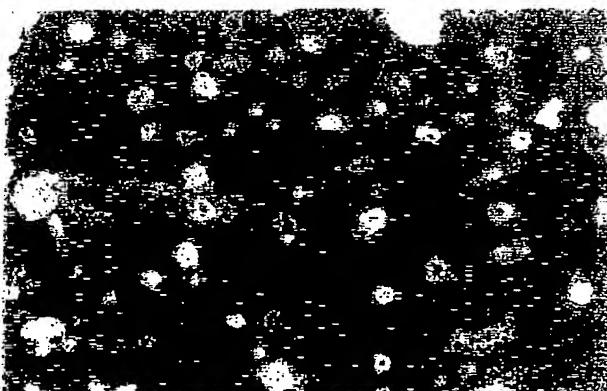
Control



cPA添加

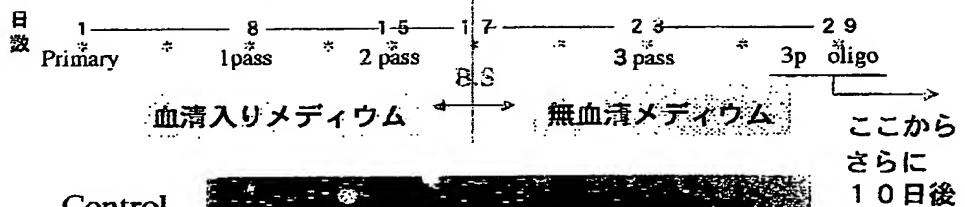


LPA添加

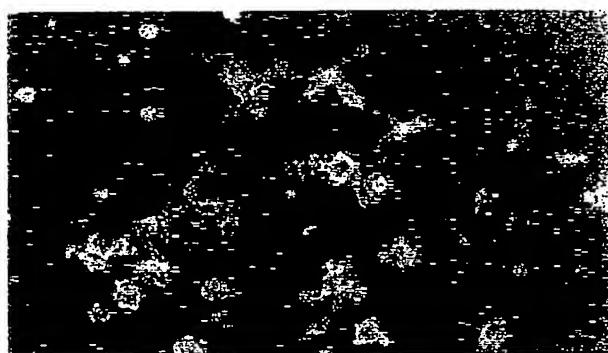


【図13】

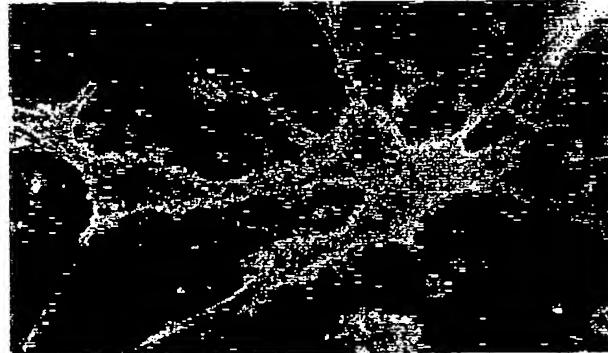
3p - Oligo—10日目



Control



cPA添加



LPA添加



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B065 AA93X BB11 CA44
4C086 AA01 AA02 DA35 MA01 MA04
NA14 ZA02 ZA15